

## ⑫ 公開特許公報(A)

平1-254699

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)10月11日

C 07 K 7/40  
A 61 K 37/26  
// C 07 K 99:26

ADP

8318-4H  
8615-4C

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全5頁)

⑮ 発明の名称 インスリン誘導体及びその用途

⑯ 特 願 昭63-83912

⑰ 出 願 昭63(1988)4月5日

⑱ 発 明 者 村、西 昌 三 京都府京都市上京区烏丸通一条上ル西入ル観三橋町562番地19号

⑲ 発 明 者 木 曾 良 明 大阪府茨木市稲葉町15番地26号

⑳ 出 願 人 小 玉 株 式 会 社 東京都千代田区神田佐久間町3丁目2番地

㉑ 代 理 人 弁理士 尊 優 美 外2名

## 明 細 書

インスリン誘導体に関するものである。

(従来技術)

## 1. 発明の名称

インスリン誘導体及びその用途

## 2. 特許請求の範囲

- (1) インスリンB鎖のB<sub>1</sub>、又はB<sub>2</sub>のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸が結合したインスリン。
- (2) インスリンB鎖のB<sub>1</sub>、及びB<sub>2</sub>のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸が結合したインスリン。
- (3) 請求項第1項記載の化合物の薬理的許容量を有効成分とする医薬組成物。
- (4) 請求項第2項記載の化合物の薬理的許容量を有効成分とする医薬組成物。
- (5) 糖尿病治療剤である請求項第3項及び第4項のいずれか1項記載の医薬組成物。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規なインスリン誘導体、さらに詳しくは糖尿病における血糖降下剤として有用な

インスリンは膵臓のランゲルハンス氏島より分泌されるアミノ酸残基51個からなるペプチドで、血液中のグルコース量の調節を行っているホルモンである。何らかの原因で膵臓からのインスリン分泌の調整に異常を来すと、高血糖症状となり糖尿病と診断される。糖尿病患者は、放置しておくと、高血糖状態から種々の疾患を合併し死に到ることも多くない。従って、この高血糖状態を正常化させるために、インスリンを投与し改善する必要がある。投与されるインスリンとしては、ウシ、ブタの膵臓から抽出精製されたもの或は、大腸菌を遺伝子組み換えによりヒト型のものとしたもの又はブタインスリンを酵素化学的にヒト型に変換したものが用いられている。

ヒトインスリンとウシインスリン、ブタインスリンの相違は、下記一般式(1)で表わしたインスリン分子のA-鎖Bと10(A<sub>10</sub>とA<sub>11</sub>)

のアミノ酸がアラニン及びバリンで、B-鎖30(B<sub>30</sub>)がアラニンであるものがウシインスリンであり、B-鎖30のアミノ酸がアラニン、A-鎖8と10のアミノ酸がスレオニン及びイソロイシンよりなっているのがブタインスリンであり、A-鎖8、10のアミノ酸がスレオニン、イソロイシン、B-鎖30のアミノ酸がスレオニンよりなっているのがヒトインスリンである。

このようなヒト、ブタ又はウシインスリンを注射剤として患者に必要量皮下又は筋肉に投与し、血糖を調整している。

糖尿病患者はこのインスリン注射を毎日、一生の間施行しなければならず、注射に伴う疼痛や注射部位の変性など肉体的苦痛ははなはだ大きいものがある。

このようなインスリン注射に伴う苦痛を除くため、経口投与や経鼻、直腸投与などの方法が研究されている。

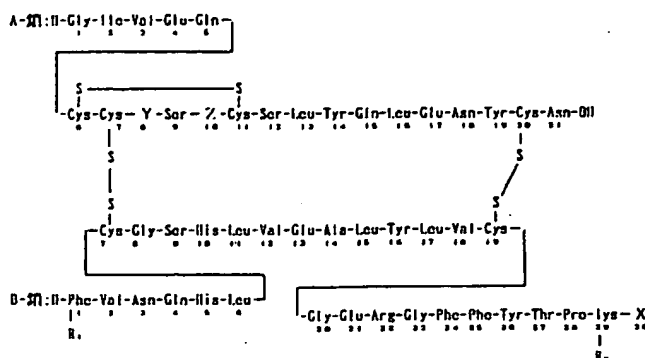
これらの方法は、何れも吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤等とインスリンとを製剤技術

ることを目的とするものである。

(課題を解決するための手段)

その結果、本発明者は、インスリンの活性を失うことなく、血糖降下作用を示す、脂溶性インスリンとして新規な脂肪酸化インスリンを見出し本発明を完成させた。

本発明の新規なインスリン誘導体は、一般式(1)：



的に調合したものである。これらの例を挙げると、酵素阻害剤と配合する方法(ダンフォースら: *Endocrinology* 55, 175, 1978)、乳化剤により油性乳剤とする方法(七里ら, *Acta Diabet. Lat.* 15, 175, 1978)、リポソームにする方法(Yoshida: EPA 140,085)、又インスリン粒子をアゾポリマーで被覆し消化酵素の分泌されない大腸で放出させる方法がある(M. Saffran: *Canadian J. Biochem.*, 57, 548, 1979)。

又、経皮的持続往入用インスリンとしては、嚙化インスリン(米国特許第 4478830号、第 4478746号、第 4483792号、第 4489063号、第 4489064号及び第 4536572号明細書)が知られている。このものは、従来インスリン注射剤では結晶が析出し、長期保存に耐えないことから種々の嚙化インスリンとしたものである。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は、医薬として許容される安定なインスリン製剤に適するインスリン誘導体を提供す

(式中R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は同一又は異って脂肪酸基を改変し、X及びYは同一でスレオニン又はアラニンを改変し、ZはX及びYがスレオニンのときイソロイシンを改変し、X及びYがアラニンのときバリンを改変す。

又、式中 Phe: フェニルアラニン、Ile: イソロイシン、Val: バリン、Glu: グルタミン酸、Gln: グルタミン、Cys: システイン、Ser: セリン、Leu: ロイシン、Tyr: チロシン、Asn: アスパラギン、His: ヒスチジン、Gly: グリシン、Ala: アラニン、Arg: アルギニン、Thr: スレオニン、Pro: プロリン、を改変す。)

で改変される。

本発明化合物は糖尿病における血糖降下剤として有用である。

本発明の脂肪酸化インスリンは、上記一般式(1)で示すようにインスリンB鎖のB<sub>1</sub>及びB<sub>30</sub>のいずれか一方又は両方のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸を結合せしめたものである。

本発明においてインスリンは、ヒト、ブタ及びウシインスリンの何れも使用できる。

本発明において結合させる脂肪酸としては、炭素原子数 7~21前後のものが好ましく、例えばカプリル酸、ベラルゴン酸、カプリン酸、ウンデシル酸、ラウリン酸、トリデシル酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、パルミチン酸、ヘプタデシル酸、ステアリン酸、ノナデカン酸、フラキン酸、ウンデシレン酸、オレイン酸、エライジン酸、セトレイン酸、エルカ酸、ブラシジン酸、ソルビン酸、リノール酸、リノレイン酸が挙げられる。特に、パルミチン酸が好ましい。

本発明による化合物は、例えば以下のような方法で得ることができる。

工程(1):脂肪酸の活性化エステル合成

工程(2):インスリンのp-メトキシベンゾキシカルボニルアジド(pMZ)化(pMZ-インスリンの生成)

工程(3):脂肪酸活性エステルとpMZ-インス

リンとの結合

工程(4):pMZ基の除去

工程(5):分離精製・保存

上記各工程について説明すると次のとおりである。

工程(1)の活性化エステルの合成は、脂肪酸そのものでは反応性がなく、そのままではインスリンと結合しないため、脂肪酸のカルボキシル基を活性化させ反応性を高めるために行なう。一具体例としては、N-ヒドロキシサクシイミドエステルとする。

工程(2)のインスリンのp-メトキシベンゾキシカルボニルアジド化は、インスリンA鎖中のアミノ酸(Gly:)特にA<sub>1</sub>のアミノ基が脂肪酸によって置換されることにより、インスリンそのものの活性が低下をすることから、アミノ基の保護のためpMZ化を行なう。

工程(3)は工程(2)で得たpMZ-インスリンと工程(1)の活性脂肪酸エステルとの結

合反応で、この結合はジメチルホルムアミド溶媒中で、室温にて攪拌することにより容易に進行する。

工程(4)で工程(2)において導入した保護基であるpMZを、トリフルオロ酢酸により脱離させる。

工程(5)の精製はゲルろ過を行った後、高速液体クロマトグラフィーにより、インスリンB鎖のB<sub>1</sub>及びB<sub>29</sub>のいずれか一方のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸を結合せしめたもの(R<sub>1</sub>又はR<sub>29</sub>に脂肪酸が結合したインスリン)、B<sub>1</sub>及びB<sub>29</sub>の両方のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸を結合せしめたもの(R<sub>1</sub>又はR<sub>29</sub>に脂肪酸が結合したインスリン)を得る。

得られたインスリン誘導体は、二次凍結乾燥し粉末として得ることができる。

(実施例及び試験例)

以下に本発明を実施例により説明するが、本発明はこれに限定されるものでない。

#### 参考例1 脂肪酸活性化エステルの製法

酢酸エチル 150ml にパルミチン酸及びN-ヒドロキシサクシイミド50mMを加えたのち、氷冷しながらジシクロヘキシルカルボジイミド50mMを加え24時間攪拌する。反応終了後、反応液をろ過し、溶媒を留去したのち、残渣をエタノールより再結晶し、パルチン酸N-ヒドロキシサクシイミドエステルを得る。

#### 参考例2 pMZ化インスリンの製法

ウシインスリン1mM及びp-メトキシベンゾキシカルボニルアジド4mMを1N-炭酸水素ナトリウム溶液・水・ジメチルホルムアミド(2:3:4)の溶液に溶かし、室温で3時間攪拌する。反応終了後、50%酢酸を加え溶媒を留去する。残渣をエーテル及び1%酢酸で洗い、50%酢酸に溶かし凍結乾燥してp-メトキシカルボジイミドインスリンを得た。

実施例

p M Z-インスリン 1 m M をジメチルホルムアミドに溶かし、これにバルミチン酸 N-ヒドロキシサクシイミドエステル 50 m M を加え、室温で 3 時間攪拌する。反応後溶液を留去し、残渣にアニソール及びトリフルオロ酢酸を加え氷冷下 1 時間攪拌する。

その後トリフルオロ酢酸を留去し、残渣にエーテルを加え、生じた沈殿をろ過し、残渣をエーテルで洗浄した。

得られた残渣を 1 N 酢酸に溶解し、セファデックス-G 25 を充てんしたカラムによりゲルろ過を行いインスリン画分を濃縮した。

インスリン画分を凍結乾燥した後、アセトニトリル：0.3% トリフルオロ酢酸混液（2：3）に溶かし、高速液体クロマトグラフィーにより、Lys-B<sub>29</sub> バルミトイルインスリン（pal-1）、Phe-B<sub>1</sub> バルミトイルインスリン（pal-2）、Phe-B<sub>1</sub>-Lys-B<sub>29</sub> ジバルミトイルインスリン（pal-3）を得た。

高速クロマトグラムの結果を第 1 図に示

す。

上記により得られたまたインスリン誘導体の脂肪酸結合部位の同定は、該誘導体の脱アミノ化を行なった後、酸分解し、すべてのペプチド結合を切断して 51 個のアミノ酸に分解した後、アミノ酸分析計により分析した。

アミノ酸分析値を第 1 表に示す。表に示すようにインスリン（未変性物）には遊離のアミノ基が 3 か所あり、これを脱アミノ化するとアミノ基が消失するためアミノ酸分析計で測定できないが、脂肪酸が結合していた場合脱アミノ化を受けないため、生インスリンと脱アミノ化物とを比較したとき脂肪酸が結合している部位のみ 1 つ多く出るため結合部位が同定できる。

第 1 表 アミノ酸分析値

アミノ酸	インスリン			脱アミノ化			脱アミノ化インスリン		
	計算値	未変性物	脱アミノ化物	pal-1	pal-2	pal-3	pal-1	pal-2	pal-3
Asp	3	2.93	3.03	3.47	3.12	3.05	3.47	3.12	3.05
Thr	1	0.94	0.96	0.97	1.00	1.00	0.97	1.00	1.00
Ser	3	2.54	2.71	3.05	2.80	2.71	3.05	2.80	2.71
Glu	7	7.32	7.5	8.25	7.39	7.49	8.25	7.39	7.49
Pro	1	1.15	1.23	1.00	1.09	1.09	1.00	1.09	1.09
Gly	4	4.05	3.36	3.28	3.26	3.26	3.28	3.26	3.26
Ala	3	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Cys	3	2.38	2.4	-	0.94	1.73	-	0.94	1.73
Val	5	3.3	3.7	4.87	4.19	4.04	4.87	4.19	4.04
Ile	1	0.31	0.28	0.62	0.53	0.55	0.62	0.53	0.55
Leu	6	5.42	5.56	6.47	5.81	5.67	6.47	5.81	5.67
Tyr	4	3.91	1.65	-	2.77	2.90	-	2.77	2.90
Phe	3	2.58	2.21	2.94	2.83	2.21	2.94	2.83	2.21
Lys	1	0.95	0.09	0.05	0.69	0.79	0.05	0.69	0.79
His	2	1.96	1.93	2.09	1.94	2.01	2.09	1.94	2.01
Arg	1	1.1	1.09	1.92	1.89	1.51	1.92	1.89	1.51

#### 試験例（血糖降下作用）

ウイスター系雄性ラットを絶食 24 時間後、ペントバルビタール麻酔下背位に固定し、被験薬剤を 1 N-塩酸に溶解又は懸濁し、大動脈より静注又は大動脈に筋注した。投与量はインスリンとして 100  $\mu$ g/匹とした。投与後、頸動脈より採血し、血中グルコース量を測定した。

結果を第 2 図に示す。

図からわかるように、本発明のインスリン誘導体 Pal-1 及び 2 は、顯著に血中グルコース値を低下させる。

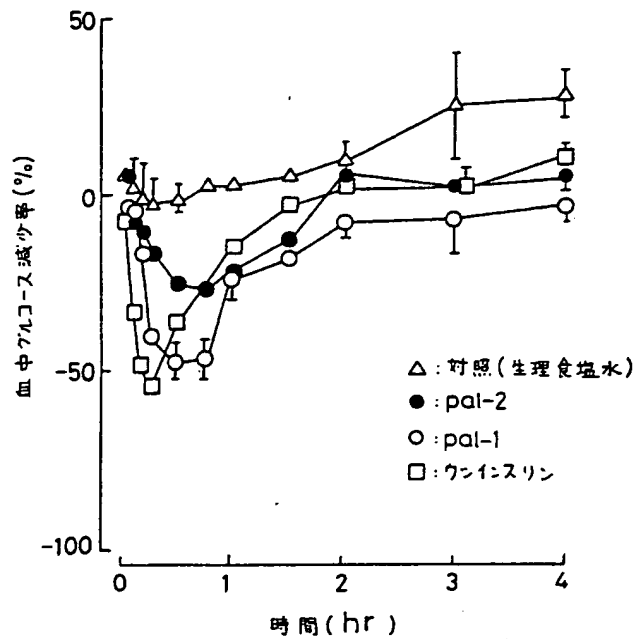
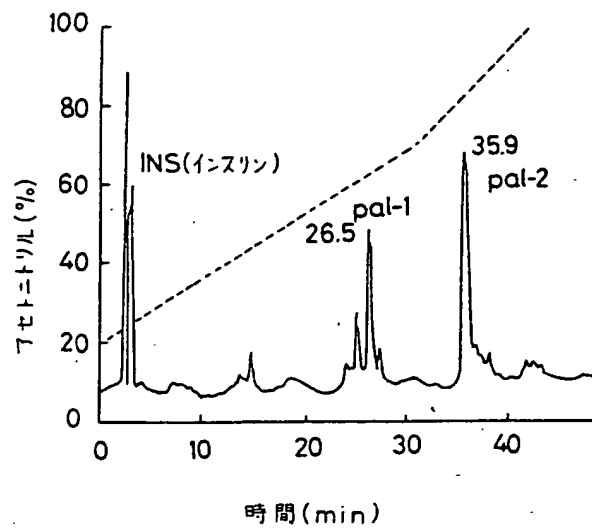
#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は高速液体クロマトグラムの結果を示すグラフ。

第 2 図は投与後の血中グルコース値の変化を示すグラフである。

図 2

図 1



BEST AVAILABLE COPY